Algunas enzimas como las peroxidasas funcionan como indicadores de la influencia del estrés abiótico pudiendo ser monitoreadas a través de variaciones que causan en sus actividades. Poco se sabe al respecto de la actividad de esta enzima en plantas del genero *Capsicum* en condiciones de estrés hídrico (Segatto *et al.*, 2005).

Las Peroxidasas son enzimas oxido-reductoras producidas por las plantas, están presentes en múltiples formas isoenzimáticas. Éstas cumplen funciones fisiológicas en la célula de la planta, como el reforzamiento de la pared celular, la oxidación de fenoles, suberización, cicatrización de heridas, oxidación del acido indol-3-acetico (Badea *et al.*, 2000).

La germinación y emergencia de semillas de pimiento es lenta, particularmente están condicionadas por las bajas temperaturas, y cuando son sembradas directamente, su germinación es bastante desuniforme, necesitando de varias repeticiones, es por ello y debido a la dificultad de obtener altas tasas de germinación y emergencia de plántulas de pimiento que se ha incitado a realizar estudios orientados a establecer tratamientos que superen este problema (Kenneth & Sanders, 1987; Prucoli *et al.*, 2004).

Los tratamientos pregerminativos de semillas pueden ser usados para acelerar el proceso germinativo y uniformizar la germinación, favoreciendo la germinación en diferentes condiciones de estrés manteniendo la viabilidad de las semillas (Solange, *et al.*, 1999; Aparecida *et al.*, 2001).

Dentro de ellos podemos citar al osmoacondicionamiento, una técnica que se basa en el principio del control de la imbibición de la semilla a un nivel tal que le permita avanzar en el metabolismo pregerminativo pero que evite la emergencia de la radícula evitando daños al embrión. Cuando estas semillas son sometidas a condiciones favorables para la germinación, ellas se imbiben de nuevo en forma acelerada y sus radículas emergen en forma rápida y simultánea (Oluoch & Welbaum, 1996; Reis *et al.*, 2005).

Entre los efectos principales del osmoacondicionamiento se encuentra el aumento en vigor de las semillas, denominado revigorización por la acción de algunos agentes osmóticos, entre los cuales las sales de potasio, tienen efectos nutricionales. También se mencionan efectos que sin aportar nutrientes a las semillas aumentan su vigor, por ejemplo, la reparación de los daños subcelulares ocurridos durante el almacenamiento de las semillas, la cual puede mejorar sustancialmente la velocidad de germinación en semillas con un avanzado nivel de deterioro, permitiendo un mejor aprovechamiento de las semillas (Peres *et al.*, 2007; Piedrahita, 1998; Solange *et al.*, 1999).

Una vía fisiológica conocida dentro del osmoacondicionamiento, para incrementar la capacidad germinativa son los tratamientos de hidratación y deshidratación de las semillas, consiste en la inmersión de la semillas en una solución de concentración determinada por un período dado; hidratada la semilla, se activa su metabolismo en forma controlada, de tal manera que la germinación no ocurre. Estos procedimientos permiten que una gran proporción de las semillas alcance rápidamente el mismo nivel de humedad y un estado fisiológico que active el aparato metabólico relacionado con el proceso pregerminativo y la autoreparación enzimática de las membranas celulares (Marín *et al.*, 2007; Montejo *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 1997).

El resultado del osmoacondicionamiento es afectado por una compleja interacción de factores tales como: especie, agente osmoacondicionante, potencial osmótico, periodo de acondicionamiento, temperatura de la solución osmótica, vigor de la semilla, condiciones de secado y almacenamiento después del tratamiento, entre otros. Diversos productos químicos han sido utilizados para el osmoacondicionamiento de semillas, como sales inorgánicas (K_3PO_4, KH_2PO_4, $MgSO_4$, NaCl, KNO_3, KCl, Na_2SO_4), componentes orgánicos de bajo peso molecular (manitol, sorbitol, glicerol, sacarosa) y polietilenglicol (Mora *et al.*, 2006; Peres *et al.*, 2007).

El manitol viene siendo utilizado hace unos años como osmoacondicionante con el fin de evitar el efecto de las sales, y de asegurar la inocuidad de las sustancias empleadas, por su composición química inerte y no toxica. Trabajos en soya, berenjena, pepino, melón y cebolla entre otros, verifican que el osmoacondicionamiento con manitol presenta buenos resultados en la germinación de semillas en relación a otros tipos de agentes químicos con el mismo potencial osmótico (Ávila *et al.*, 2007; Rojo *et al.*, 2005).

El objetivo fue determinar la actividad de las peroxidasas solubles durante la germinación de semillas de *Capsicum annuum* L. *cv* Papri King y Papri Queen osmoacondicionadas con manitol, a diferentes tiempos de exposición y almacenamiento.

Materiales y métodos

Las semillas de *Capsicum annuum* L. cv Papri King y Papri Queen, fueron proporcionadas por la empresa Agronegocios Génesis. Las muestras fueron divididas en 5 grupos de 50 semillas, con tres réplicas por tratamiento; las cuales fueron sometidas a un proceso de osmoacondicionamiento.

El osmoacondicionamiento de las semillas se realizó en bandejas de 18 cm x 11 cm x 3.5 cm, sobre dos capas de papel de filtro Whatman Nº 01 embebidos en una solución de manitol, la cual genero un potencial osmótico de -1.1MPa. Este osmoacondicionamiento fue mantenido en una cámara de germinación por 0, 12 y 24 horas, a una temperatura de 20±2ºC en oscuridad (Ávila *et al.*, 2007).

Después del osmoacondicionamiento, las semillas fueron secadas a temperatura ambiente y almacenadas por 3 y 5 días en sobres manila.

Evaluación de la germinación

Posterior al osmoacondicionamiento y almacenamiento de las semillas, se realizó la prueba estándar de germinación bajo un diseño experimental en bloques completamente al azar con tres repeticiones de 50 semillas, en bandejas de 18 cm x 11 cm x 3.5 cm, sobre dos capas de papel de filtro Whatman Nº 01 embebidos hasta la saturación. Esta prueba se realizo en una cámara de germinación a una temperatura de 20±2ºC y 80% de humedad relativa en oscuridad durante 18 días; diariamente se registro el numero de semillas germinadas para calcular el porcentaje de germinación (PG).

Extracción de Peroxidasas Solubles

Se realizó de acuerdo a lo descrito por Chance y Mahely (1955); se colocó 1 g de tejido fresco con 1 ml de Buffer Tris HCl pH 7.2, 25 µl de Benzamidina por 5 minutos, en un sistema acondicionado en frio. El filtrado se realizó en gasa y las alícuotas se centrifugaron a 10 000 rpm durante 10 minutos a 4 ºC.

Determinación de la Actividad de Peroxidasas

La actividad enzimática se determinó según el método de Chance y Mahely (1955), usando o-phenylenediamine (o-PDA) como sustrato. La mezcla de reacción estuvo constituida por citrato de sodio 0.1 M pH 4.5, 10 µl del extracto de la enzima, 5 mM o-PDA y 0.002% H_2O_2 (v/v) en 1 ml de volumen final a 25 ºC. La actividad enzimática fue cuantificada en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8452, a 450 nm.

Finalmente la actividad de peroxidasas solubles se expresó en ìmoles de o-PDA oxidado/minuto, utilizando el coeficiente de extinción.

Análisis Estadístico

Los resultados fueron analizados a través de la prueba F, del análisis de varianza; y la comparación de medias con la prueba de significación múltiple Tukey ($p<0.05$). Se utilizó el software de análisis estadístico SPSS 15.0.

Resultados

Actividad de las Peroxidasas

La actividad de peroxidasas solubles en semillas de *Capsicum annuum* L. *cv* Papri King y Papri Queen, mostraron diferencias significativas en los tratamientos 24h 3d y 24h 5d ($P<0.05$).

En la Fig. 1, se observa la actividad promedio de las peroxidasas solubles en semillas de *C. annuum* L. para ambas variedades. La actividad de las peroxidasas solubles se incrementa con el tiempo de exposición al manitol y almacenamiento prolongado. Se puede apreciar que el promedio de la actividad de las peroxidasas solubles no mostraron diferencias significativas ($P<0.05$) para el Control, 12h 3d, 12h 5d en las dos variedades de *C. annuum* L. Para los tratamientos 24h 3d y 24h 5d, la actividad de peroxidasas solubles aumentó en ambas variedades, encontrándose el valor más alto para el tratamiento 24h 5d *cv* Papri Queen (3,501 ìmoles/minuto).

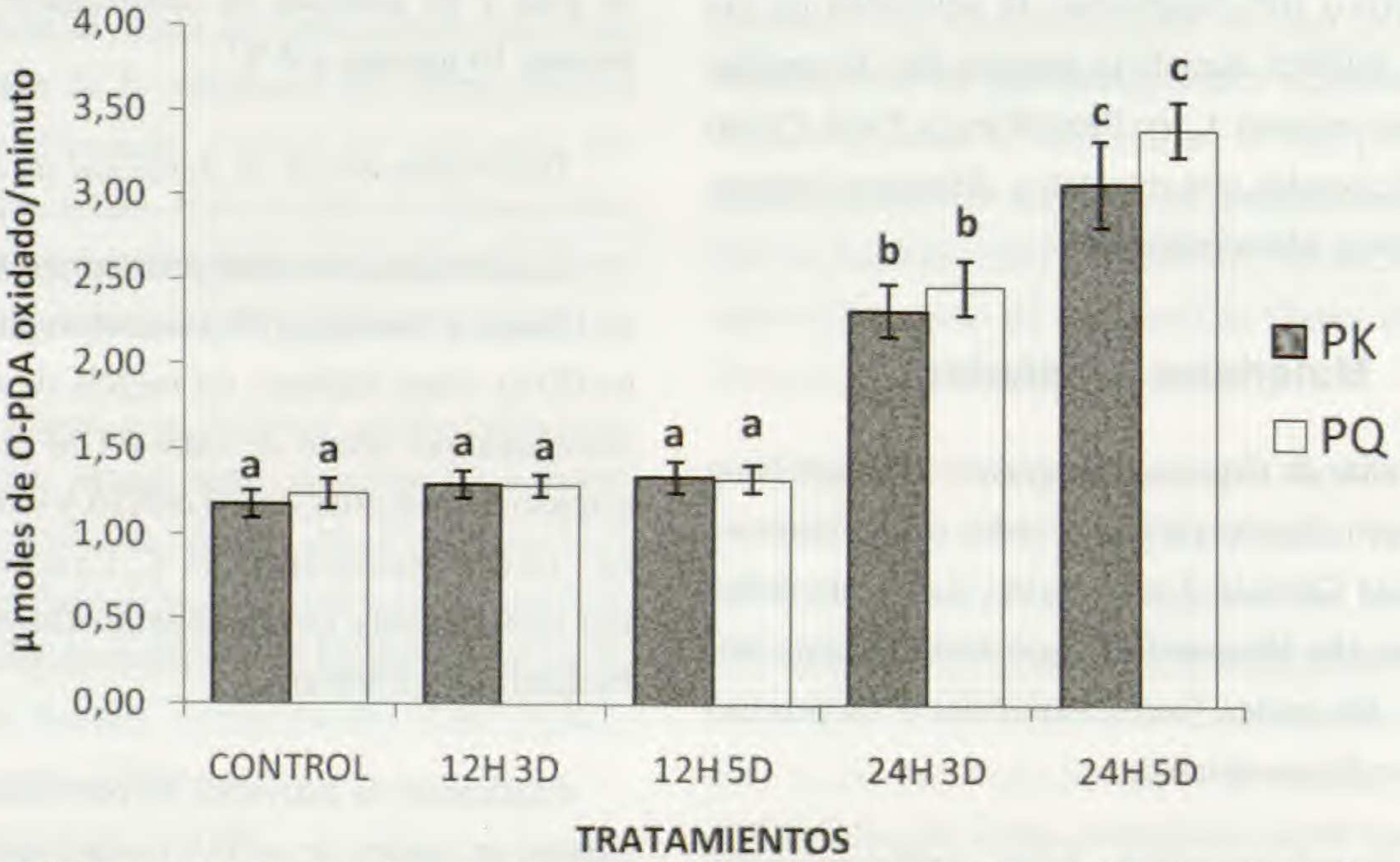

Fig. 1. Actividad de las peroxidasas en semillas de *Capsicum annuum* L. *cv* Papri King y Papri Queen osmoacondicionadas durante 0, 12, 24 horas y almacenadas por 0, 3, 5 días.

Porcentaje de Germinación

Los valores obtenidos reflejaron una curva sigmoide para ambas variedades de *Capsicum annuum* L durante la evaluación del porcentaje de germinación.

El análisis estadístico realizado para ambas variedades de *C. annuum* L., mostraron diferencias significativas ($p<0.05$) entre los tratamientos 24h 3d y 24h 5d; sin embargo, los tratamientos control, 12h 3d y 12h 5d no mostraron significancia estadística. A los 8 dias de evaluación, el porcentaje de germinacion en semillas de *C. annuum L. cv* Papri Queen alcanzó el 92% con el tratamiento 24h 3d llegando a un 94% a los 17 días; asi mismo, las semillas con el tratamiento 24h 5d evaluadas a los 8 dias reflejaron el 98%.

El porcentaje de germinación en *C. annuum L. cv* Papri King con el tratamiento 24h 3d evaluadas a los 7 días, fue de 86% llegando a 94% a los 9 días. Las semillas de *C. annuum L. cv* Papri King sometidas al tratamiento 24h 5d, alcanzaron el 88% a los 7 dias, alcanzando luego 96% a los 12 días de evaluación del porcentaje de germinación.

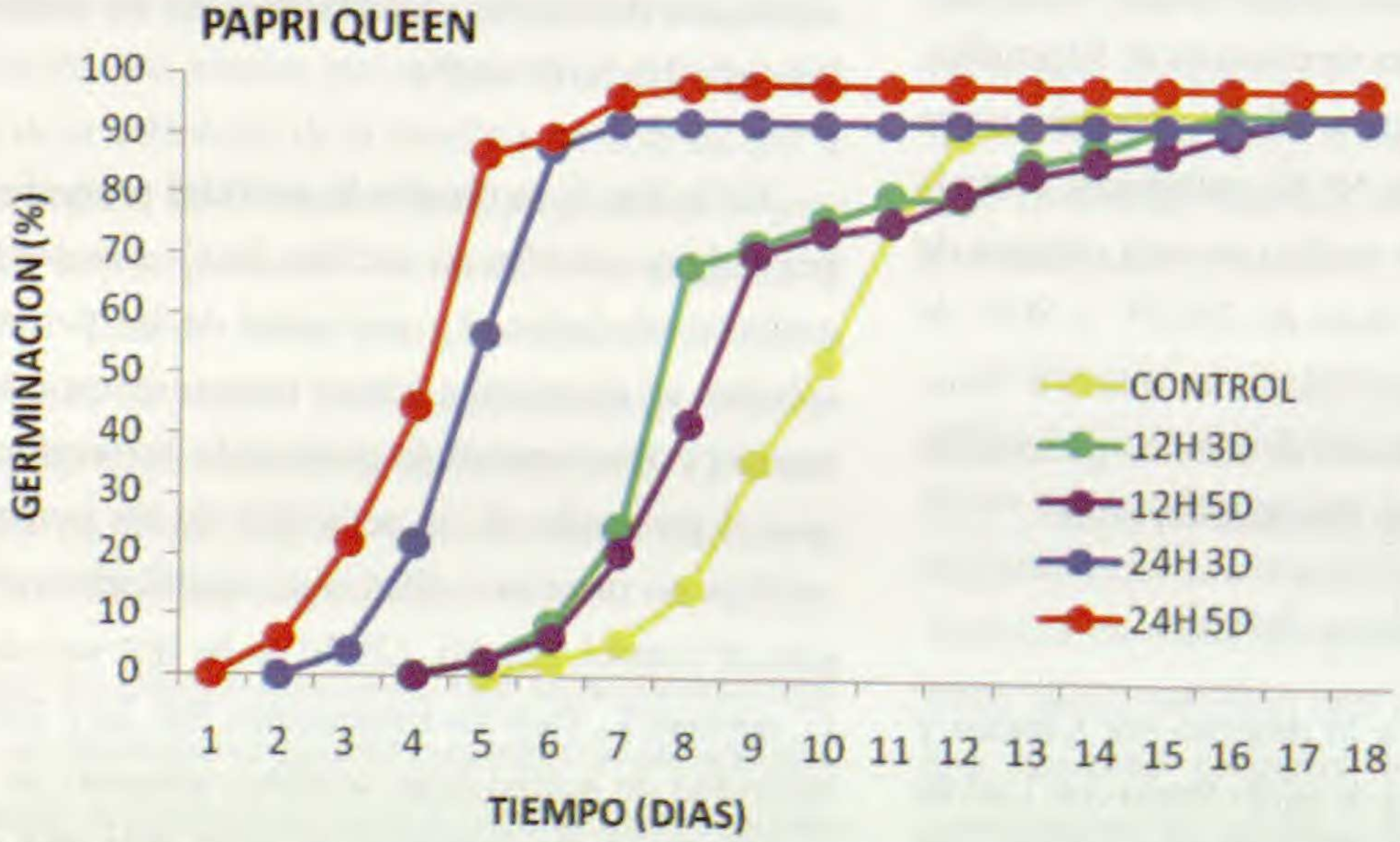

Fig. 2. Porcentaje de Germinación por día en *Capsicum annuum* L. *cv* Papri Queen, en semillas osmoacondicionadas durante 0, 12, 24 horas y almacenadas por 0, 3, 5 días.

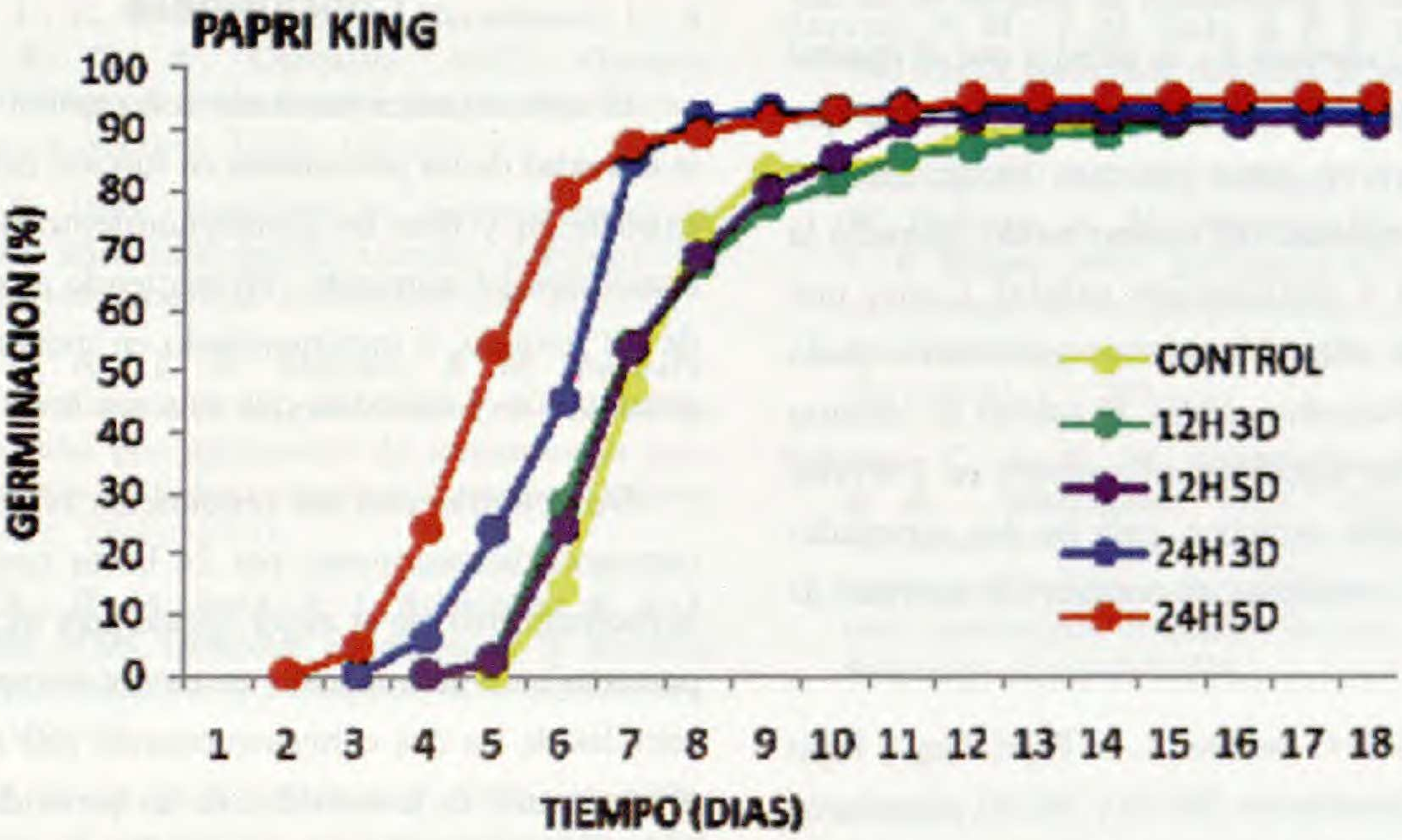

Fig. 3. Porcentaje de Germinación por día en *Capsicum annuum* L. *cv* Papri King, en semillas osmoacondicionadas durante 0, 12, 24 horas y almacenadas por 0, 3, 5 días.

Tabla 1. Porcentaje de germinación a los 18 días, en semillas de *C. annuum* L. *cv* Papri Queen *y cv* Papri King, osmoacondicionadas durante 0, 12, 24 horas y almacenadas por 0, 3, 5 días.

		MANITOL (-1,1 MPa)			
PRETRATAMIENTO	CONTROL	12H 3D	12H 5D	24H 3D	24H 5D
Papri Queen Germinación (%)	94 ± 0,9	94 ± 0,9	94 ± 0,7	94 ± 0,7	98 ± 0,3
Papri King Germinación (%)	92 ± 0,6	92 ± 0,6	92 ± 0,3	94 ± 0,7	96 ± 0,6

Discusión

La eficiencia de la técnica de osmoacondicionamiento para la obtención del máximo desempeño en la homogeneidad del porcentaje germinativo de semillas, depende del agente osmótico, potencial osmótico utilizado, duración del tratamiento, especie y semillas del mismo lote (Alvarez *et al*., 2005).

Se ha reportado que el osmoacondicionamiento viene a ser el tratamiento de hidratación y deshidratación de las semillas, que consisten en la inmersión de las mismas en soluciones osmóticas o en cantidades limitadas de agua durante cierto período de tiempo, estos procedimientos permiten que una gran proporción de las semillas alcance rápidamente el mismo nivel de humedad y un estado fisiológico que active el aparato metabólico relacionado con el proceso pregerminativo y la autoreparación enzimática de las membranas celulares (Gutiérrez, 2006; Sánchez *et al.*, 1997).

Los resultados obtenidos en la presente investigación, sugieren que el osmoacondicionamiento fue eficiente en revertir el proceso deteriorativo, es decir reparó los daños celulares ocurridos durante el almacenamiento de las semillas, lo cual a su vez mejoro el vigor de las semillas, permitiendo una mayor actividad metabólica pregerminativa en consecuencia se incremento el porcentaje de germinación (Piedrahita, 1998; Solange *et al*., 1999).

Una de las principales ventajas del osmoacondicionamiento, seria promover una emergencia más rápida y uniforme de las semillas en campo, proporcionando un estándar adecuado, lo mismo en condiciones adversas (Solange *et al*., 1999).

La mejora en la germinación de semillas de las dos variedades de *C. annuum* L., se debió a que el manitol no solo controló el proceso de hidratación, sino que también influyó en otros procesos bioquímicos y fisiológicos complejos, del mismo modo, propició la revigorización y restauración celular. Como una consecuencia de ello, el porcentaje germinativo pudo incrementarse (Piedrahita, 1998). El análisis de varianza reflejó diferencias significativas ($p<0.05$) en 2 niveles diferentes de estrés osmótico, para las dos variedades de *C. annuum* L. evaluadas, en relación a la actividad de peroxidasas.

Las semillas de *C. annuum* L. *cv* Papri King y Papri Queen con los tratamientos 24h 3d y 24h 5d, presentarón mayor actividad de las peroxidasas en comparación de los demás tratamientos, esto podría atribuirse al tiempo de exposición en la solución con manitol y al periodo de almacenamiento de las semillas. En tal sentido, el incremento de la actividad enzimática en semillas almacenadas, podría provocar algunos disturbios y afectar la aptitud de las semillas para dejar el letargo y eso conllevaría al incremento de la actividad de las peroxidasas (Badea *et al*., 2000).

Las Peroxidasas al ser enzimas oxido-reductoras producidas por las plantas, tienen varios papeles fisiológicos en la célula de la planta, dentro de las cuales esta el incremento en el vigor de las semillas por medio de la oxidación de fenoles entre otras además de la oxidación del acido indol-3-acetico (Badea et al., 2000).

A medida que se incrementa el tiempo de exposición de las semillas a la solución de manitol, se observó un aumento en la velocidad germinativa de las semillas. El tiempo de 24 horas de osmoacondicionamiento fue superior al de 12 horas, presentando las primeras semillas germinadas en el 2 y 3 días para la variedad PQ asimismo 3 y 4 días para la variedad PK. Estos resultados son semejantes a los obtenidos por (Pereira et al. 2005) que observaron una correlación negativa entre la duración del osmoacondicionamiento y el tiempo para que ocurra el 50% de la germinación de semillas de pimiento, es decir a mayor tiempo de duración del osmoacondicionamiento menor será el tiempo para que ocurra el 50% de la germinación.

Conclusiones

El osmoacondicionamiento con manitol incrementa la actividad de las peroxidasas en función del tiempo de exposición y días de almacenamiento posterior al osmoacondicionamiento, favoreciendo el desempeño de las semillas, e incrementando en menor tiempo la germinación y asiéndola que esta sea homogénea.

De acuerdo con las tendencias observadas, el osmoacondicionamiento por 24 horas con 5 días de almacenamiento fue la mejor opción para incrementar el porcentaje de germinación en menor tiempo, para las semillas de los dos cultivares estando esté relacionado al incremento de la actividad de las peroxidasas.

Literatura citada

Alvarez, T. G.; A. B. Gatti; C. B. Primieri & G. S. Juliano. 2005. Priming temperature effects on viability and vigor of *Pterogyne nitens* Tull seeds. Revista Brasileira de Sementes. 27(2): 35-43.

Aparecida, F. S.; V. R. Daiton; J. T. Rodrigues. 2001. Efficiency of the osmotic osmopriming on Lettuce seeds. Revista Brasileira de Sementes, 23(1): 28-133.

Ávila, M. R.; A. D. Braccini; J. R. Scapim; R. J. Fagliari & J.L. Dos Santos. 2007. Influence of manitol-induced water stress on Canola seed germination and seedling growth. Revista Brasileira de Sementes. 29(1): 98-106.

Badea, E.; G. Marinescu; C. Babeanu; M. Corneanu & G. Corneanu. 2000. Peroxidase isoenzymes pattern and total activity in *Arachis hypogaea* in vivo culture under conditions similar to extraterrestrial environment. Plant Peroxidase Newsletter. 14:139-146.

Casas, D. A. 2004. El cultivo de páprika en la costa peruana, programa de extensión en riego y asistencia técnica – PERAT Coordinación zonal sur, del proyecto subsectorial de Irrigación PSI.

Chaman, M. E. 2007. Variaciones en el contenido relativo de agua y la concentración de prolina en *Capsicum annuum* L. inducido por NaCl. Arnaldoa 14(2): 251-258.

Chance, B. & A. Maheley. 1955. Assay of Catalases and Peroxidases, Meth. Enzymol. 2: 764 - 775.

Gutierrez, H. G. 2006. Fisiología del osmo-acondicionamiento del maíz. Becario por exclusividad COFAA-IPN, UPIBI-IPN, Bioprocesos Mexico DF.

Kenneth, W. J. & D. C. Sanders. 1987. The influence of soaking pepper seed in water or potassium salt solutions on germination at three temperatures. Journal of Seed Technology. 11(1): 97-102.

Marín, S. J.; C. J. Mejía; L. A. Hernández; L. A. Peña & C. A. Carballo. 2007. Osmotic conditioning of husk tomato seeds. Agricultura Técnica en México. 33(2): 115-123.

Molinari, S. 1991. Induction of isoperoxidases in resistant and susceptible tomato cultivars by *Meloidogyne incognita*. J. Nematol. 23: 254-258.

Montejo, L. A.; J. A. Sánchez & M. Bárbara. 2002. Incremento de la germinación en semillas de fruta bomba por aplicación de tratamientos pre-germinativos de hidratación-deshidratación. Cultivos Tropicales. 23(4): 27-31.

Mora, A. R.; H. M. Ireta; P. J. Rodríguez & S. J. Martínez. 2006. Osmostic conditioning in *Brassica oleracea* L. seeds. Revista Chapingo Serie Horticultura. 12(1): 105-112

Oluoch, M. O. & G. E. Welbaum. 1996. Viability and vigor of osmotically primed muskmelon sedes after nine years of storage. J. amer. Soc Hort. Sci. 121(2): 408-413.

Pereira, A.; H. Kikuti & K. Minami. 2005. Physiological conditioning in sweet pepper seeds. Revista Ciência Agronômica. 36(2): 243–248.

Peres, B. R.; F. B. Borba; A. E. Emérito; O. F. Fraccaro & S. C. Gualtieiri. 2007. Effects of priming with or without drying on *Pterogyne nitens* TUL. seeds under stress. Ciência Florestal, Santa Maria. 17(2): 119-128.

Piedrahita, C. E. 1998. Aumento del vigor en semillas de *Pinus patula* (SCHLECHT & CHAM) Por efecto del osmoacondicionamiento. Universidad Nacional de Colombia. Crónica Forestal y del Medio Ambiente. 13(1): 5 - 23.

Prucoli, P. S.; S. R. Ferreira & V. H. Duarte. 2004. Influence of storage temperature on the germinative potential of sweet pepper seeds submitted to hydration and priming. Revista Brasileira de Sementes. 26(1): 38-43.

Reis, M. A.; C. E. Araújo; S. N. Aparecida; E. Balbinot; S. R. Ferreira & B. D. Guerra. 2005. Effects of the embebition and osmoconditioning in *Ttriplaris americana* seeds. Revista Brasileira de Sementes. 27(2): 111-116.

Rojo, H. C. 2005. Acondicionamiento osmótico de simientes de girasol (*Helianthus annuus* L.) para el avance de la germinación en siembras precoces para zonas áridas. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos.

Sánchez, J.; E. Calvo; O. Ramón & Muñoz, B. 1997. Tratamientos pregerminativos de hidratacion-deshidratacion para semillas de pepino (*Cucumis sativus* L.). Acta Botánica Mexicana. 38:13-20.

Seevers, P. M.; J. M. Daly & F. F. Catadral. 1971. The role of peroxidase isozymes in resistance to wheat stem rust disease. Plant Physiol. 48: 353-360.

Segatto, S. B.; M. G. Pereira; Y. P. Neves; M. W. Pedrosa; A. M. Moreira; W. A. Pedrosa & L. F. Finger. 2005. Influência do estresse hídrico na atividade da enzima peroxidase em plantas jovens de *Capsicum baccatum*. Brazilian Journal of Plant Physiology. 17: 258

Solange, C. J.; C. M. Guimarães; G. R. Mendes & R. Rodrigues. 1999. Physiological and biochemical changes in pepper seeds submitted to osmo-conditioning, using differents osmotic agents and imbebition medium. Revista Brasileira de Sementes. 21(2):217-223.